Rev. Protección Veg. Vol. 30 No. 2 (Mayo.-ago. 2015): 139-147
ISSN: 2224-4697

ARTÍCULO ORIGINAL

Efecto de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg sobre el desarrollo del tomate y *Meloidogyne incognita* (Kofoid Y White) Chitwood[1]

Daine Hernández-Ochandía, Mayra G. Rodríguez, Belkis Peteira, Ileana Miranda, Yailén Arias, Benedicto Martínez

Dirección de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, CP 32700, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: daineh@censa.edu.cu.

RESUMEN: El objetivo de este trabajo fue determinar el potencial de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg como agente de control biológico de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood. Se utilizaron las cepas *Ta*.1, *Ta*.13, *Ta*.25, *Ta*.78, *Ta*.79 y *Ta*.90, seleccionadas previamente por su alta capacidad antagónica, producción de metabolitos y adaptación a diversas condiciones ambientales y sustratos. En los ensayos *in vitro*, se evaluó el efecto de las cepas sobre juveniles de *M. incognita* y se utilizaron las diluciones de 1/10; 1/25; 1/50 y filtrado puro de cada una de las cepas y un tratamiento control (agua estéril). Para el estudio en condiciones semicontroladas, las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) se inocularon con 2,5 juveniles de segundo estadio (J_2) por gramo de suelo y a las 72 horas se adicionó inóculo de la cepa *Ta*.90; se aplicó 10^7UCF por maceta. Los tratamientos fueron: plantas sanas (control absoluto), plantas + *Ta*.90; plantas +*Ta*.90 + nematodos, plantas + nematodo y nematodos + *Ta*.90 (sin plantas). A los 35 días se evaluaron los parámetros: Índice de Agallamiento (IA), número de huevos del nematodo por sistema radical, altura de planta, diámetro del tallo, longitud de la raíz, número de hojas y masa fresca de raíz. Los filtrados de las cepas de *T. asperellum* causaron altos niveles de mortalidad y sobresalió la cepa *Ta*.90 con 90% de mortalidad a las 24 horas. En macetas, dicha cepa provocó una disminución en el número de huevos por hembras, lo que difiere significativamente del testigo sin aplicar y atenuó el efecto del nematodo sobre los parámetros: altura, diámetro del tallo, número de hojas y masa fresca aérea.

Palabras clave: control biológico de nematodos, tomate, nematodos agalleros, *Trichoderma.*

Effect of *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt and Nirenberg strains on the development of tomato and *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood population

ABSTRACT: The objective of this study was to determine the potential of strains of *Trichoderma asperellum*, Lieckfeldt & Nirenberg to control *M. incognita*, (Kofoid and White) Chitwood. Under laboratory conditions (*in vitro*), six native strains of *T. asperellum* (*Ta*.25, *Ta*.1, *Ta*.90, Ta.78, *Ta*.79, and *T*.13) were selected for their high antagonistic capability, production of various metabolites, and adaptation to different environmental conditions and substrates. For the *in vitro trial*, 1/10, 1/25, 1/50 dilutions and the pure filtrate of each strain were tested, including a control treatment with sterile water. For the study under semi-controlled conditions, tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants were inoculated with 2.5 second instar juveniles (J) per gram of soil and, after 72 hours, 10^7CFU of the strain *Ta*.90 were added per pot The treatments were: healthy plants (absolute control), plants + *Ta*.90, plants +*Ta*.90 + nematodes, plants + nematodes, and nematodes + *Ta*.90 (without plants). The parameters evaluated after 35 days were galling index (IA), number of eggs per root system, plant height, stem diameter, root length, number of leaves, and weight of fresh root. High mortality

---

[1] Los resultados son parte de la Tesis de Maestro en Ciencias en Sanidad Vegetal presentada por el primer autor y fueron desarrollados en el marco del Proyecto «Diagnóstico y manejo de plagas en granos con énfasis en el desarrollo y uso de productos bioactivos». Programa Nacional de Salud Animal y Vegetal. Cuba (2013-2016).

levels were shown by all the *T. asperellum* strain filtrates; the strain *Ta*.90 stood out with 90% mortality at 24 hours. In the pot trial, this latter strain significantly reduced the number of eggs per female compared with the unapplied control, and attenuated the effect of the nematode on parameters such as plant height, stem diameter, number of leaves, and root fresh weight.

Key words: biological control of nematodes, tomato, root knot nematode, *Trichoderma.*

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los vegetales más apetecidos a nivel mundial. Su popularidad se debe a que sus frutos son consumidos frescos, en múltiples formas procesadas (conservas de tomate, tomate deshidratado) y en alimentos basados en tomate (1).

Los nematodos representan una de las principales plagas del cultivo, donde el género *Meloidogyne* es el más distribuido y dañino, pues provoca pérdidas del 20-33% en los rendimientos a escala mundial (2).

En Cuba, la especie que más afecta al tomate, y la más distribuida en plantaciones tradicionales y en producciones protegidas, es *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood (3).

Diversos insumos biológicos se desarrollaron en el país para el manejo de nematodos agalleros (4); sin embargo, no se cubren aún las demandas de estos productos. Al respecto, se conoce que las cepas de *Trichoderma* se utilizaron con éxito en el manejo de plagas de suelo en Cuba (5) y a nivel internacional, lo que sugiere que este género resulta efectivo como agente de control biológico de nematodos parásitos de plantas (6).

Diversas cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels se seleccionaron en Cuba por su acción sobre *Fusarium* spp. (5), y resulta de interés determinar su efecto sobre *M. incognita* y establecer sus potencialidades para ser empleadas en el manejo del complejo *Meloidogyne-Fusarium.*

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de cepas cubanas seleccionadas de *T. asperellum* sobre *M. incognita* y el tomate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de cepas de *T. asperellum* como potenciales agentes de control biológico de *Meloidogyne* sp.

Para los ensayos se utilizaron las cepas de *T. asperellum* (*Ta*.1, *Ta*.13, *Ta*.25, *Ta*.78, *Ta*.79 y *Ta*.90) provenientes de la colección del Laboratorio de Micología Vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) y una población de *M. incognita* raza 2 proveniente del banco de poblaciones del Laboratorio de Nematología Agrícola del CENSA.

Selección *in vitro* de cepas de *T. asperellum*

Efecto toxigénico de filtrados de *T. asperellum* sobre *M. incognita*

Se sembraron los discos de 5 mm (Ø) de las cepas en el centro de placas de 90 mm de diámetro que contenían medio de cultivo Agar Malta (AM, Biocen) y se incubaron a 30^{o}C y oscuridad por 72 h. De la periferia de las colonias de cada cepa de *Trichoderma,* se tomaron tres discos (Ø=3 mm) y se inocularon en dos frascos de 100 ml de capacidad por cepa, contentivos de 30 ml de medio de cultivo líquido Richard (pH 5,5). Posteriormente, los frascos se agitaron en una zaranda orbital a 250 rpm y temperatura de 24-26°C, durante 48 horas. Los cultivos obtenidos se filtraron a través de papel de filtro estéril (Whatman No.1) y posteriormente por filtros miliporo de 0,22 µm. Los filtrados se colectaron en erlenmeyers estériles y se conservaron en frascos estériles a 4°C hasta su utilización.

Las ootecas de *M. incognita* se extrajeron de raíces de tomate (cv. Campbell 28) y se colocaron a eclosionar en siracusas con agua destilada estéril a 28°C, en una incubadora Friocell®, utilizando la metodología de Baermann modificada (7). Los juveniles de segundo estadio (J_2) se colectaron a las 72 horas.

Se tomaron 10 J_2 y se depositaron en placas de 48 pocillos, a los que se les añadió 1 ml de las diluciones 1/10; 1/25; 1/50 y filtrado puro de cada una de las cepas de *T. asperellum* por separado. Como controles se utilizaron agua destilada estéril y el medio de cultivo Richard estéril sin inocular.

Transcurridas 24 horas, se extrajeron los juveniles de cada tratamiento y se colocaron en siracusas con agua destilada estéril, durante otras 24 horas, al cabo de las cuales se contabilizaron los J, vivos y muertos. Posteriormente, se colocaron en portaobjetos escavados estériles con 50µl de agua destilada, se observaron al microscopio óptico Zess®, con 600 aumentos.

Los datos relacionados con el número de juveniles muertos (expresados en porcentaje de mortalidad) se transformaron mediante la expresión arc»% y se sometieron a análisis de varianza simple y la diferencia entre las medias se estableció a través del test de Tukey ($p<0,05$) del paquete estadístico SAS 9.0.

Efecto parasítico de las cepas de *T. asperellum* sobre *M. incognita*

Las cepas de *T. asperellum* se cultivaron en placas de 70 mm (Ø), en medio de cultivo AM (Biocen) y se incubaron a 30°C y oscuridad por 72 h. Después de este tiempo, a las colonias obtenidas de cada cepa por separado, se les adicionaron 5 ml de agua destilada estéril y se homogeneizaron con una espátula de *Drigalski*. A las suspensiones obtenidas se les ajustó la concentración de conidios a 10^8 UFC.ml^{-1}.

En sicuracusas independientes, que contenían 100µl de la suspensión de conidios de cada cepa por separado, se depositaron cinco ootecas de *M. incognita*. Después de 24h, se colectaron los huevos de manera independiente con una espátula y se pasaron a placas de 30 mm de ø con agua estéril, se agitaron suavemente para lavarlos y se colocaron sobre portaobjetos estériles en cámaras húmedas hasta 48-72h. Pasado este tiempo, se observaron al microscopio (ZEISS®) con 200 aumentos y una cámara (CANNON® 4.6mpx) acoplada al microscopio, para determinar el parasitismo de huevos.

Efecto de una cepa seleccionada de *T. asperellum* sobre el desarrollo del tomate y la población de *M. incognita*

El experimento se realizó en condiciones semicontroladas en aisladores biológicos del CENSA y se usó una cepa de *T. asperellum*, seleccionada por los resultados en los experimentos anteriores.

Para el establecimiento del semillero se utilizó una bandeja de polietileno con alveolos de dimensiones 100x30 cm. Se usó como sustrato suelo Ferralsol Éutrico, esterilizado a vapor dos veces en autoclave (121C°- 1 h). El sustrato después de la esterilización tuvo un pH de 6,5. En cada alveolo se sembró una semilla de tomate de cv. Cambell-28 y las plantas que emergieron permanecieron en la instalación a temperatura ambiente, con riegos en días alternos hasta su trasplante.

Se utilizaron macetas de 1kg de capacidad, previamente desinfectadas con NaOCl (2 horas). El inóculo de juveniles de *M. ingonita* se extrajo de raíces agalladas utilizando el método de Hussey y Barker (8). Se inocularon las macetas con 2 500 juveniles infestivos cada una, para un nivel poblacional de 2,5 J_2 por cada gramo de suelo. Transcurridas 72 horas de haber inoculado las macetas con los nematodos, se aplicó una suspensión de la cepa seleccionada de *T. asperellum* a una dosis de 10^7 UFC por maceta. Las plantas de tomate se trasplantaron (una por maceta) transcurridas 48 horas de la inoculación del hongo.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con siete réplicas (macetas) por cada tratamiento. Estos fueron: 1) testigo absoluto: plantas de tomate sanas, en macetas sin nematodos y sin aplicación de *Trichoderma*; 2) plantas en macetas con nematodos; 3) plantas en macetas tratadas con *T. asperellum;* 4) plantas en macetas inoculadas con nematodos y tratadas con *T. asperellum.* Las plantas se mantuvieron durante 35 días, con riego manual en días alternos y al final de este periodo se realizaron diferentes análisis.

Se evaluaron a las plantas los parámetros de desarrollo: altura de las plantas; longitud de raíces principales; diámetro del tallo y masa fresca aérea y de raíces. La altura y longitud de raíces se evaluaron con una cinta métrica. Para establecer el diámetro de los tallos, a nivel del cuello de la raíz, se usó un Pie de Rey. Por su parte, la masa se determinó en una balanza técnica electrónica marca KERN® (e=0,01g).

Los valores de los parámetros de desarrollo se sometieron a análisis de varianza simple y las diferencias entre las medias se establecieron a través del test de Tukey ($p<0,05$), utilizando el paquete estadístico SAS 9.0.

Los sistemas radicales se analizaron después que se evaluaron los parámetros de las plantas, y para ello se tomaron dos plantas para los análisis del hongo y cinco para los correspondientes a los nematodos.

Las raíces de cada una de las plantas se lavaron cuidadosamente y se observaron en el microscopio estereoscópico STEMI DV4®. Las pertenecientes a las plantas con los tratamientos 2, 3 y 4 se tiñeron con fuschina ácida (0,05%) al calor durante 30 segundos y se preservaron en placas Petri con lactofenol sin colorante. Se determinaron los parámetros Número de agallas y se estableció el índice de agallamiento (9).

El número de huevos producidos por hembra se determinó en los tratamientos 2 y 4, y se tomaron al azar 10 hembras con sus ootecas de cada una de las cinco plantas. Las ootecas se colocaron sobre portaobjetos, en una gota de agua destilada y se les colocó un cubreobjeto. Las láminas se observaron en microscopio óptico (Zess con 200 aumentos) y se contó el número de huevos por cada hembra.

Los datos se compararon mediante ANOVA simple y la diferencia entre las medias se estableció por la

Prueba de Tukey ($p<0,05$), utilizando el paquete estadístico SAS 9.0.

Por otra parte, las raíces se lavaron con agua corriente primero y agua destilada después para el análisis micológico. Del tratamiento 4, se tomaron tres fragmentos de raíces de tres mm de longitud cada uno por planta, se sembraron asépticamente en placas de 90 mm de Ø contentivas de medio papa dextrosa agar (PDA, Biocen) y se incubaron a 30ºC durante siete días. Se observó si se produjo o no crecimiento del hongo alrededor del fragmento de raíz.

Colonización de ootecas por *T. asperellum*: se homogeneizaron las raíces de las plantas de tomate de los tratamientos donde estaba presente *T. asperellum* y los nematodos; de estos se tomaron 20 ootecas. Se prepararon dos placas con medio de cultivo agar agua más antibiótico (cloranfenicol 0,01%). Se tomaron las ootecas, se lavaron con agua destilada estéril tres veces, se sembraron tres por cada placa y se incubaron durante cuatro días a 28±2ºC. Se cuantificó el número de ootecas parasitadas y se expresó en porcentaje.

Parasitismo de huevos: se extrajeron 20 ootecas por cada tratamiento, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se suspendieron en 1ml de agua estéril en siracusas estériles. Posteriormente, de cada siracusa, y con el auxilio de un estereoscopio ZEISS, se extrajeron huevos- y se colocaron con un asa de siembra en tres puntos en una placa que contenía medio agar agua más el antibiótico. Las placas se incubaron durante cuatro días a 28±2ºC. Las observaciones se realizaron en el microscopio óptico Wild ™ con 400 y 1000 aumentos y se cuantificó el número de huevos parasitados y se expresó en porcentaje

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de cepas de *T. asperellum* como potenciales agentes de control biológico de *M. incognita* raza 2

Efecto toxigénico de filtrados de *T. asperellum* sobre *M. incognita*

Se produjeron diferencias significativas entre los valores de mortalidad provocados por las cepas de *T. asperellum* sobre los juveniles de *M. incognita*. Solo la dilución de 1/50 de tres cepas ocasionó porcentajes de mortalidad en los juveniles de *M. incognita* por encima de 70%, distinguiéndose la cepa *Ta.* 90 con 90% de mortalidad a las 24 horas (Fig. 1). Por su parte, las cepas *Ta.* 13 y *Ta.* 25 provocaron menor afectación sobre los juveniles de *M. incognita,* mientras que los filtrados de la cepa *Ta.* 1 produjeron la menor mortalidad.

Las larvas muertas por la acción de los filtrados de *T. asperellum* presentaron deformaciones y rupturas en su cutícula, así como vacuolas y desorganización en el contenido interno.

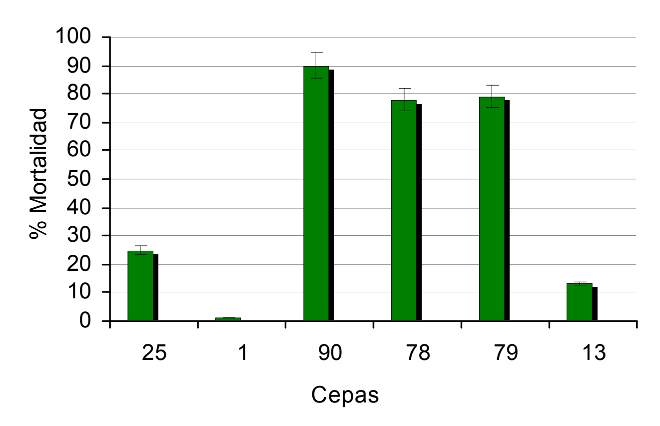


FIGURA 1. Mortalidad de juveniles de *M. incognita* provocada por de cepas cubanas de *T. asperellum* en estudio *in vitro*. (Dilución 1/50) (EE=0)./ *Mortality caused by Cuban T. asperellum strains on M. incognita juveniles in an in vitro assay.*

La acción de los filtrados provenientes de los cultivos de cepas de *T. asperellum* sobre *M. incognita* podría estar relacionado con las enzimas producidas por *Trichoderma* spp., que son enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas, proteasas, entre otras, capaces de degradar la pared celular de patógenos (10).

La cepa *Ta*. 90 produce quitinasas y β-1,3-glucanasas, enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular en los patógenos, que desempeñan una función esencial en el parasitismo (11). Debido a que la hipodermis de los nematodos es rica en glucógenos y lípidos (12), es posible que estas enzimas pudieran estar actuando sobre esta y otros tejidos de los juveniles y provocar la muerte de nematodos. Este aspecto debe ser objeto de investigaciones futuras.

La actividad antagónica de *Trichoderma* depende más del aislamiento y del hospedante que de la propia especie del biorregulador, lo que se corroboró con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde hubo diferencias entre las cepas de *T. asperellum* evaluadas. Esto ratifica la importancia de los estudios de selección de cepas, que incluyan la evaluación de los filtrados de cultivos de cepas de *Trichoderma* y donde

se determinen posteriormente las enzimas involucradas en el proceso patogénico.

Este mecanismo, conjuntamente con otros como la competencia (por espacio y nutrientes), micoparasitismo y desactivación de enzimas de los patógenos, le permiten a *Trichoderma* ejercer su acción como antagonista y ser colonizador de las raíces, pudiendo inducir resistencia en plantas (11). Es por ello, que la multiplicidad de estos mecanismos en un aislamiento es una característica importante para su selección como agente de control biológico (13).

Otro aspecto a tener presente es que las cepas nativas son más efectivas que las importadas (5, 14). En este estudio de la eficacia *in vitro*, todas las cepas evaluadas fueron nativas, lo que aporta mayor valor práctico al resultado en cuanto a su posibilidad de ser introducidas en el manejo de *M. incognita*.

Efecto parasítico de las cepas de *T. asperellum* sobre *M. incognita*

Se pudo constatar que la cepa *Ta*. 90 de *T. asperellum* tuvo acción parasítica sobre huevos de *M. incognita* raza 2 (Fig. 2), no así el resto de las cepas evaluadas. Se observó desorganización en el contenido interno de los huevos con la aparición de secciones oscurecidas, espacios o vacuolas y las hifas del hongo emergiendo de los mismos, lo que evidencia que hubo penetración del hongo al interior del huevo y muerte de los embriones.

Al respecto, Druzhinina *et al*. (15), en su revisión sobre el género *Trichoderma,* plantearon que los aislados de diferentes especies de este agente de control biológico fueron capaces de parasitar huevos y juveniles del segundo estadio de nematodos formadores de agallas (*Meloidogyne* spp.).

La envoltura o cubierta de los huevos de nematodos posee tres capas, una externa de vitelina, una media de quitina y otra interna de lípidos (12). La infección de los huevos, por parte de cepas de *Trichoderma* spp., es posible debido al incremento en la actividad de enzimas como quitinasas y proteasas, cuando el hongo entra en contacto con los huevos o juveniles (13).

Se encontró, además, que la matriz gelatinosa donde se depositan los huevos promueve la atracción del hongo y mejora las capacidades parasíticas de numerosos aislados de *Trichoderma*, que utilizan esta matriz como fuente de nutrientes (16).

La función de las quitinasas secretadas por este agente de control biológico en la infección de huevos de nematodos se comprobó por Saheban y Hadavi (13) en el ensayo de *T. harzianum* sobre *M. javanica*. Estos autores señalaron que es posible que la penetración en los huevos se produzca, también, por la acción de otras enzimas líticas.



FIGURA 2. Huevo de *M. incognita* raza 2 parasitado por *T. asperellum* cepa *Ta*. 90. (1000 aumentos)./ *Egg of M. incognita race 2 parasitized by T. asperellum Ta. 90 strain. (1000X).*

A partir de los resultados obtenidos en estos ensayos *in vitro*, se seleccionó la cepa *Ta*. 90 para llevar a cabo el estudio en condiciones semicontroladas, pues evidenció la mayor mortalidad en juveniles y el parasitismo de huevos de *M. incognita* raza 2.

Efecto de la cepa seleccionada de *T. asperellum* sobre el desarrollo del tomate y la población de *M. incognita* raza 2

Excepto en la longitud de raíz principal, en el resto de los parámetros evaluados se manifestaron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 1).

Las plantas con mayor altura fueron las del testigo absoluto y las que recibieron tratamiento con la cepa *Ta*. 90, con diferencias significativas con las plantas parasitadas por los nematodos. El mayor valor del diámetro del tallo se produjo en las plantas tratadas con *T. asperellum*, mientas que el menor se presentó en las plantas inoculadas con *M. incognita,* sin diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Las plantas tratadas con *T. asperellum* tuvieron mayor número de hojas y masa fresca aérea, con diferencias significativas con los otros tratamientos. Con relación a la masa fresca de raíces, los mayores valores se obtuvieron en los tratamientos con nematodos, sin diferencias significativas entre ellos, seguidos por el tratamiento que solo recibió *T. asperellum* que presentó diferencias con el testigo absoluto, el de menor valor de masa fresca de raíz (Tabla 1).

TABLA 1. Efecto de la interacción *M. incognita* - *T. asperellum* en plantas de tomate cv. Campbell-28./ *Effect of* **M. incognita - T. asperellum** interaction on tomato plants cv. Campbell-28

Tratamientos	Altura de plantas (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Número hojas	Masa fresca aérea (g)	Masa fresca raíces (g)	Long. raíz principal (cm)
Plantas inoculadas con nematodos	27,14 b	4,86 b	7,86b	16,69 c	7,27 a	22,43
Plantas inoculadas con nematodos y tratadas con *T. asperellum*	32,14 ab	6,86 b	9,71 a	46,44 a	5,76 ab	25,5
Plantas tratadas con *T. asperellum*	37,57 a	14 ,71 a	9,86 a	55,32 a	4,61 b	31,14
Plantas testigos	34,43 ab	5,71 b	6,86b	31,48 b	2,49 c	25,71
ESx	2,19	4,74	0,73	8,49	1,0	1,81

La presencia de nematodos agalleros en las raíces de las plantas provoca diversos efectos sobre el crecimiento y el rendimiento, debido a su acción parasítica (17). De manera general, los nematodos afectaron negativamente el desarrollo de las plantas, solo la masa y el volumen de las raíces se incrementan en las plantas con nematodos, debido a la presencia de las agallas.

Sin embargo, la aplicación de *T. asperellum* cepa *Ta*. 90 atenuó el efecto del nematodo en parámetros como altura, diámetro del tallo, número de hojas y masa fresca aérea; se mostraron plantas con buen vigor. Desde el punto de vista práctico, sería conveniente su uso en la producción protegida de hortalizas, donde los nematodos están siempre presentes en los suelos y, además, porque pueden disminuir el ataque de *Fusarium* spp., y con ello los daños que ocasiona el complejo *Fusarium*-nematodo en el cultivo del tomate.

Este tipo de comportamiento se observa en plantas de tomate parasitadas por *Meloidogyne* spp. y tratadas con *Trichoderma*, se obtiene un follaje más exuberante en estas plantas que en el testigo con nematodos (18). Asimismo se encontró que la aplicación de Trifender (producto cuyo ingrediente activo es una cepa de *T. asperellum*) no tuvo efecto sobre el número de hembras de *Meloidogyne*, pero la altura de las plantas de pimiento aumentó entre 12-15% y el rendimiento entre el 25-35% durante el primer año del experimento, mientras que al siguiente el número de hembras disminuyó en el 33% y la altura de las plantas se incrementó en 11-18% (19). Otros autores observaron incremento en altura, diámetro de tallos, masa fresca y rendimiento de tomate cultivar M2 tratado con *Trichoderma* spp., aun en presencia de *Meloidogyne* spp.; demostraron que, al compararlo con el control sin tratar, *Trichoderma* spp. incrementa la masa de la raíz y el tallo del tomate y del tabaco hasta el 46%, (20).

Entre los efectos positivos de la inoculación con *Trichoderma* se incluye la de mejorar la respuesta de las plantas ante el ataque de patógenos en la raíz, contribuir a la solubilidad de los nutrientes del suelo y al aumento del desarrollo de las raíces, logrando una mayor formación de pelos radiculares y, por consiguiente, un enraizamiento más profundo (21).

No se encontraron diferencias significativas ($p<0,05$) con relación al número de agallas por sistema radical entre los tratamientos (2: planta + nematodos y 4: planta + nematodos + biorregulador), no obstante, se produjo una disminución en el número medio de agallas por raíz. En el tratamiento con la aplicación de *T. asperellum* cepa *Ta*. 90 se disminuyó el número de agallas por raíz en más del 10%, respecto a las plantas no tratadas. De igual modo, no se encontraron diferencias significativas en el Índice de agallamiento, con 3,71 y 3,57, respectivamente.

Algunos factores pudieron actuar para que no se produjera una disminución marcada del índice de agallamiento y del número de agallas con relación al testigo, entre ellos aparecen que el número inicial de nematodos introducido en este estudio fue un «nivel de reto» y se señaló que los agentes de control biológico de nematodos actúan mejor sobre bajas poblaciones.

Como en el ensayo *in vitro* esta cepa produjo mortalidad de 90% de los juveniles, se evaluó frente a un nivel poblacional alto de nematodos para determinar el

impacto de la misma, aplicada luego de que el nematodo ya estuviera en el suelo (como ocurre en las aplicaciones curativas). En este ensayo, con la aplicación de *Ta.* 90, también se produjo menor número de agallas, aunque sin diferencias significativas, lo que indica que el hongo parasitó un porcentaje de juveniles antes que penetraran en las raíces y produjeran más agallas (16). En estudios posteriores con esta cepa, se debe tomar en cuenta este aspecto y evaluar diferentes niveles poblacionales iniciales de *M. incognita*, así como los momentos de introducir el biorregulador al sistema, de manera que se pueda establecer la efectividad técnica del agente para el manejo de nematodos en forma óptima.

La aplicación de *T. asperellum* cepa *Ta*. 90 provocó una disminución en el número de huevos por hembras, difiriendo significativamente con el testigo sin aplicación (Fig. 3).

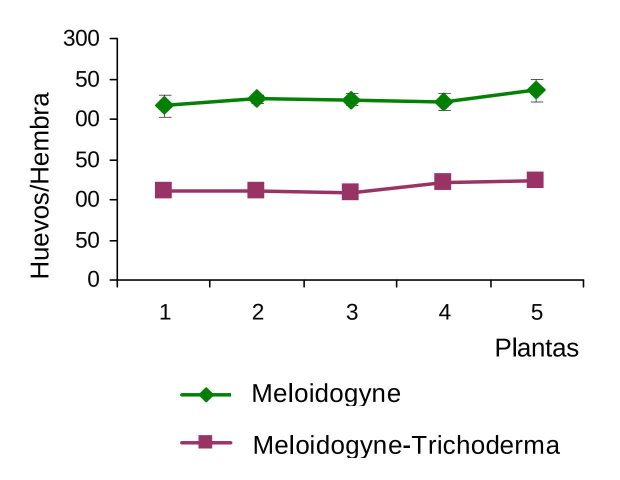


FIGURA 3. Efecto de *T. asperellum* cepa *Ta*. 90 sobre el número de huevos por hembra de *M. incognita* raza 2. (EE=18,4;CV=0,34)./ *Effect of the strain* ***T****. asperellum Ta. 90 on the number of eggs per female of M. incognita race 2 (SE = 18.4; CV = 0.34).*

Este resultado tiene significación práctica, pues representa una disminución de más 50% de los huevos que darían origen a nuevos juveniles y re-infestarían el cultivo, teniendo en cuenta que el ciclo del tomate es de más de 100 días.

La disminución en el número de huevos es una consecuencia del parasitismo detectado en ootecas y en huevos, lo que ratifica el efecto observado bajo condiciones *in vitro*. Esto es una evidencia del potente sistema enzimático que posee la cepa *Ta*. 90, capaz de ejercer su efecto bajo diversos ambientes, aspecto que fue detectado con anterioridad en diferentes sustratos, donde mostró elevada actividad quitinasa y glucanasa entre los cinco y siete días de incubación (datos no publicados). Este tiempo de incubación está en correspondencia con el de incorporación del producto al suelo antes del trasplante.

Se informó la reducción del número de huevos por ootecas cuando se aplicaron diferentes especies/cepas de *Trichoderma*, en especial cuando se aplicó *T. viride* (22). Sharon *et al*. (6) notificaron que en los tratamientos que recibieron *Trichoderma* se produjo una reducción en la producción de huevos de *Meloidogyne*; mientras que la cepa PDBC TH23 de *T. harzianum* disminuyó significativamente la multiplicación del nematodo e índice de agallamiento en relación al control en tomate (23).

Se pudo constatar que el hongo creció en todos los segmentos de raíces que se colocaron en medio de cultivo, evidenciando la presencia de *Ta*.90 en la superficie de las raíces. De igual modo, se produjo el 100% de parasitismo en ootecas y huevos de *M incognita*.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo planteado por Sharon *et al*. (16) acerca de que *Trichoderma* posee la habilidad de parasitar diferentes estadios del ciclo de vida de *Meloidogyne*, lo que demostraron con *T. asperellum* cepa 203, que interactuó con J2, hembras y huevos e interfirió en el proceso de reproducción.

Este aspecto debe continuar en estudio, debido a su importancia práctica para lograr disminuciones de las poblaciones en el tiempo, sobre todo en especies vegetales de ciclo corto, donde los productores usan las áreas para sembrar varios cultivos en el año, algunos de los cuales pueden ser susceptibles a nematodos de agallas.

Los resultados sugieren que la cepa *Ta*. 90 de *T. asperellum* posee potencialidades para ser utilizada en el manejo de *M. incognita* en tomate, pues aun cuando no se produjo una reducción significativa del índice de agallamiento y del número de agallas, se observó disminución en el número de huevos por hembra y un mejor comportamiento de las plantas, independientemente de que estuvieran parasitadas por nematodos. No obstante, resulta necesario continuar los estudios y evaluar en campo la cepa, de manera que se pueda establecer las dosis, los diferentes momentos de aplicación y otros efectos adicionales que pudiera mostrar la cepa de *Trichoderma* probada. Esto permitiría incorporar un producto de mayores perspectivas y sostenibilidad al manejo de nematodos y *Fusarium*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a Roberto Enrique Regalado, Lidia López, Noreidys Fernández y Regla Córdova, por su valioso trabajo técnico en la realización de este estudio. De igual modo, se agradece al Dr. Eduardo Sistachs por la revisión y corrección del idioma Inglés.

REFERENCIAS

1. Costa JM, Heuv E. Introduction: The tomato crop and industry. En: Tomatoes. Crop production science in horticulture series. Ep Heuvelink (ed.). CABI publisher, 2005. Pp. 1-19.

2. Sikora RA, Fernández E. Nematode of vegetable. In Plant parasite nematodo in subtropical and tropical agriculture, Second Edition, 2005. pp. 319-392.

3. Gómez L. Diagnóstico de nematodos agalleros y prácticas agronómicas para el manejo de *Meloidogyne incognita* en la Producción Protegida de Hortalizas. [Tesis en opción al grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas]. Universidad Agraria de la Habana, Cuba. 2007.100pp.

4. Rodríguez MG, Fernández E, Hidalgo-Díaz L, Cuadra R, Draguiche JM, et al. Cuba: two decades working on integrated nematode management in agricultural croping systems. Jour Nematology. 2014;46(2):227-228.

5. Martínez B, Infante D, Reyes Y. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Rev Protección Veg. 2013;28(1):1-9.

6. Sharon E, Chet I, Spiegel Y. *Trichoderma* as biological control Agent. En Biological Control of plant parasitic nematodes: Building coherence between microbial ecology and molecular mechanisms. Progress in Biological Control.11. K. Davies and Y. Speigel (Eds.). DOI 10.100 7/978-1-4020-9648-8_8. Springer Science+ Business Media, 2011, Pp. 183-201.

7. Pitcher RS, Flegg JJM. An improved final separation sieve for the extraction of plant-parasitic nematodes from soil debris. Nematologica 1968;14:123-127.

8. Hussey RS, Barker KB. A comparison of methods for colleting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Report. 1973;57:1025-1028.

9. Taylor AL, Sasser JB. Biology, Identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). 111. Dept. Pl. Pathol. N. C. State Univ, Raleigh. 1978.

10. Martínez B. Antagonismo de aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre algunos patógenos de caña de azúcar. Fitopatología. 1998; 33(4):207-211

11. González I, Infante D, Martínez B, Arias Y, González N, et al. Inducción de quitinasas y glucanasas en cepas d*e Trichoderma* sp*p*. promisorias como agentes para el control biológico. Biotecnología Aplicada. 2012;29:7-11.

12. Bird A. The structure of nematodes. Academic Press. New York and London, 1971, 318pp.

13. Saheban N, Hadavi N. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Soil Biology & Biochemistry. 2008;40(2):2016-2020.

14. Infante D, Martínez B, González N, Reyes Y. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Rev Protección Veg. 2009;24(1):14-21.

15. Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM., Monte E, et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. Nature Reviews Microbiology. 2011;9:749-759.

16. Sharon E, Chet I, Viterbo. A Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. Eur J Plant Pathology. 2007;118:247-258.

17. Hussey RS, Williamson Valerie. Physiological and molecular aspects of nematode parasitism. *Plant and nematode Interactions*. K. Barker; G. Peterson; G. Windham (Eds.) Agronomy Monograph No 36. Madison, Wisconsin. USA. 1998, Pp. 87-108.

18. Baños Y, del Busto A, Cruz R, Irisley Aguiar, Palomino Liudmila. Efecto de enmiendas orgánicas y *Trichoderma* spp. en el manejo de *Meloidogyne* spp. Rev Brasileña de Agroecologia. 2010;5(2):224-233.

19. Tímea Bíró-Stingli, Ferenc Tóth. The effect of trifender (*Trichoderma asperellum*) and the nematode-trapping fungus (*Arthrobotrys oligospora* Fresenius) on the number of the northern root-knot nematode (*Meloidogyne hapla* Chitwood) in green pepper. Journal of Plant Protection Research. 2011;51(4):371-376.

20. Pérez M. Manual Técnico. Programa de Manejo Agroecológico de nematodos en el cultivo del tabaco. Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales. ECOVIDA-Pinar del Río, Cuba. 2010, 10pp.

21. Winham MT, Elod Y, Baker R. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma spp.* Phytopathology. 1986;76:518-521.

22. Jayant Bhatt, Sengupta SK, Chaurasia RK. Management of *Meloidogyne incognita* by *Trichoderma viride* in betelvine. Indian Phytopathology. 2002;55(1):97-98.

23. Nagesh M, Hussaini SS, Ramanujam B, Chidanandaswamy BS. Management of *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* wilt complex using antagonistic fungi in tomato. Nematol Medit. 2006;34:63-68.

Recibido: 18-10-2014.
Aceptado: 6-3-2015.